

氏 名 こかじ えり  
小梶 恵利

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 253 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学 専攻

学 位 論 文 題 目  
Endoglin(CD105)is relevant to maintenance of spheroid  
formation and suppression of invasion, and its  
expression is regulated by SMAD4 in human pancreatic  
cancer cells  
(Endoglin(CD105)は SMAD4 を介した制御を受けて発現  
し, ヒト膵癌細胞の spheroid 形成の保持, 浸潤の制御に関  
与する)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	笹原 正清
(副査)	教 授	一條 裕之
(副査)	教 授	野口 京
(副査)	教 授	藤井 努
(指導教員)	教 授	井村 穰二

# 論文内容の要旨

## 〔目的〕

膵癌の90 %以上を占める膵管癌の進展の特徴として、高度な線維化を示す腫瘍間質の中を腫瘍細胞が容易に遊走・浸潤していくことが挙げられる。そこで、本研究では、膵癌の予後不良を規定する因子の一つである易浸潤性に関わる因子とその制御機構を明らかにすることを目的に、膵癌培養細胞株におけるspheroid形成能とその制御因子を探った。

## 〔方法並びに成績〕

1. ヒト膵癌組織由来の培養細胞9株 (AsPC-1、BxPC-3、KP-1NL、KP-2、KP-3、MIA-PaCa、Panc-1、SUIT-2、TCC PAN2) を用いて、通常の単層(2D)培養とともに、非接着性の条件下で三次元(3D)培養することでspheroidを形成させた。9株のうち、KP-2、KP-3は細胞同士が結合し、球状の集塊、すなわち、spheroidを形成する傾向を示した。その他の細胞株は、培地中では細胞が集簇する傾向を示すものの、細胞同士の結合が緩く、spheroidを形成するものは少なかった。得られたKP-2、KP-3のspheroidのcell block標本では、内部構造は一様で、極性を持った配列や腺管構造などの明らかな組織構築像は認めなかった。
2. 両培養を行ったKP-2、KP-3のtotal RNAを用いて、3' -IVT Arrayによる網羅的遺伝子発現解析を行った。2Dと比較して3Dで5倍以上発現が増強している遺伝子は、KP-2で1156 entities、KP-3で1139 entitiesであった。Venn diagramによる解析では、KP-2とKP-3に共通して5倍以上発現が増強していたのは212 entitiesであり、その中にはSMAD family member 4 (SMAD4)が含まれていた。
3. 用いた細胞株9株でのSMAD4 mRNAの相対発現量を確認すると、AsPC-1、BxPC-3、SUIT-2およびTCC-PAN2では殆ど発現がないか、あってもごく僅かであった。一方、KP-2、Panc-1、KP-1NL、KP-3およびMIA-PaCaでは差はあるものの、SMAD4 mRNA発現を示していた。2Dと3D培養条件下の比較では、KP-2、Panc-1、KP-3およびMIA-PaCaでは、有意に3D条件下でSMAD4 mRNAの発現の亢進を認めた。
4. KP-3において、SMAD4をknockdownし、mRNAの発現量の差異を確認した。BMP and activin membrane bound inhibitor (BAMBI)やnoggin (NOG)のmRNAは発現の亢進を示した。一方で、endoglin (ENG) mRNAは2Dでは発現に変化を認めなかったが、3Dではその発現が減弱していた。用いた細胞株9株において、ENG mRNAはいずれの細胞株においても発現が認められたが、SMAD4とほぼ同様の発現パターンを示し、KP-2、Panc-1、KP-1NLおよびMIA-PaCaの4株の細胞において高い発現を認めた。

5. KP-2において、ENGをknockdownし、3D培養を行った結果、control細胞群に比べて、ENG knockdown細胞群でspheroidの直径が有意に短くなり、spheroidの小型化がみられた。このspheroid細胞では、ENGの発現抑制に伴い、TGFB $\beta$ 2、SMAD9のmRNA発現量の減弱がみられた。また、蛋白発現ではphospho-SMAD1/5/9の変動が認められた。
6. Transwell cell invasion assayでは、Matrigel Invasion Chamber を用いて、matrigelの水和後、一定量のspheroidをupper chamberに播種した。播種0、3、6、12、18、24時間後のupper chamberのspheroidの形態を観察するとともに、その数を計測した。播種したspheroidはmatrigel上で、徐々に小型化・崩壊し、細胞が孤在化するとともにmatrigel内に浸潤する傾向を示した。Control細胞群では播種後24時間を経過しても幾つかのspheroidは残存していたのに対して、ENG knockdown細胞群では、播種後12時間後にはほぼ全てのspheroidが崩壊し、孤在性に細胞が伸展していた。播種24時間後、膜裏に浸潤した細胞を計数すると、膜裏に遊走した細胞はcontrol細胞群に比べてENG knockdown細胞群で少なかった。さらに、膜裏から剥離し、lower chamberに沈下・浮遊する細胞は、ENG knockdown細胞群の方が多かった。

〔総括〕

膀胱癌細胞ではENGはSMAD4を介したpathwayによって発現が制御されている可能性が示唆された。また、ENGは腫瘍細胞相互の結合性の保持と浸潤の抑制に働いていることが明らかになった。今後、ENGの発現とその消滅機構を明らかにすることで膀胱癌の予後を左右する易浸潤性を特異的に抑制することもできると思われる。

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 【目的】

膵癌による死亡者数は他臓器悪性腫瘍の患者死亡者数と比較しても上位に位置し、膵癌は最も予後不良な腫瘍の一つである。膵癌の 90% 以上を占める膵管癌の進展の特徴として、高度な線維化を示す腫瘍間質の中を腫瘍細胞が容易に遊走・浸潤していくことが挙げられる。そこで、本研究では、膵癌の予後不良を規定する因子の一つである高い浸潤能に関わる因子とその制御機構を明らかにすることを目的に、膵癌培養細胞株におけるspheroid形成能とその制御因子を探った。

## 【方法並びに成績】

1. ヒト膵癌組織由来の培養細胞9株（AsPC-1、BxPC-3、KP-1NL、KP-2、KP-3、MIA-PaCa、Panc-1、SUIT-2、TCC PAN2）を用いて、通常の単層(2D)培養とともに、非接着性の条件下で三次元(3D)培養することでspheroidを形成させた。9株のうち、KP-2、KP-3は細胞同士が結合し、球状の集塊、すなわち、spheroidを形成する傾向を示した。その他の細胞株は、培地中では細胞が集簇する傾向を示すものの、細胞同士の結合が緩く、spheroidを形成するものは少なかった。得られたKP-2、KP-3のspheroidのcell block標本では、内部構造は一様で、極性を持った配列や腺管構造などの明らかな組織構築像は認めなかった。
2. 両培養を行ったKP-2、KP-3のtotal RNAを用いて、3' -IVT Arrayによる網羅的遺伝子発現解析を行った。2Dと比較して3Dで5倍以上発現が増強している遺伝子は、KP-2で1156 entities KP-3で1139 entitiesであった。Venn diagramによる解析では、KP-2とKP-3に共通して5倍以上発現が増強していたのは212 entitiesであり、SMAD family member 4 (SMAD4)が含まれていた。
3. 用いた細胞株9株でのSMAD4 mRNAの相対発現量を確認すると、AsPC-1、BxPC-3、SUIT-2およびTCC-PAN2では殆ど発現がなかった。一方、KP-2、Panc-1、KP-1NL、KP-3およびMIA-PaCaでは差はあるものの、SMAD4 mRNA発現を示していた。2Dと3D培養条件下の比較では、KP-2、Panc-1、KP-3およびMIA-PaCaでは、有意に3D条件下でSMAD4 mRNAの発現の亢進を認めた。
4. KP-3において、SMAD4をknockdownし、mRNAの発現量の差異を確認した。BMP and activin membrane bound inhibitor (BAMBI)やnoggin (NOG)のmRNAは発現の亢進を示した。一方で、endoglin (ENG) mRNAは2Dでは発現に変化を認めなかったが、3Dではその発現が減弱していた。用いた細胞株9株におけるENG mRNAの発現はSMAD4とほぼ同様の発現パターンを示し、KP-2、Panc-1、KP-1NLおよびMIA-PaCaの4株の細胞において高い発現を認めた。
5. KP-2において、ENGをknockdownし、3D培養を行った結果、control細胞群に比べて、ENG knockdown細胞群でspheroidの直径が有意に短くなり、spheroidの小型化がみられた。spheroid細胞では、ENGの発現抑制に伴い、TGFB2、SMAD9のmRNA発現量の減弱がみられた。また、蛋白発現ではphospho-SMAD1/5/9の変動が認められた。

6. Transwell cell invasion assayでは、Matrigel Invasion Chamber を用いて、matrigelの水和後、一定量のspheroidをupper chamberに播種した。播種0、3、6、12、18、24時間後のupper chamberのspheroidの形態を観察するとともに、その数を計測した。播種したspheroidはmatrigel上で、徐々に小型化・崩壊し、細胞が孤在化するとともにmatrigel内に浸潤する傾向を示した。Control細胞群では播種後24時間を経過しても幾つかのspheroidは残存していたのに対して、ENG knockdown細胞群では、播種後12時間後にはほぼ全てのspheroidが崩壊し、孤在性に細胞が伸展していた。播種24時間後、膜裏に浸潤した細胞を計数すると、膜裏に遊走した細胞はcontrol細胞群に比べてENG knockdown細胞群で少なかった。さらに、膜裏から剥離し、lower chamberに沈下・浮遊する細胞は、ENG knockdown細胞群の方が多かった。

#### 【総括】

膵癌の予後は極めて悪く、高い浸潤能がその主たる要因である。本研究では膵癌細胞が高い浸潤能を示す分子機序を当該培養細胞株を用いて検討した。網羅的な遺伝子発現解析等により孤細胞性に増殖する通常の二次元培養に比較して豊富な細胞接着によりSpheroidを形成する三次元培養でSMAD4発現が豊富で、その下流でendoglin (ENG) 発現が亢進することを見出した。ENG発現の抑制はSpheroid形成を抑制し癌細胞の孤細胞性の浸潤能を亢進させた。以上より本研究では異なった様式の培養系で膵癌細胞に発現する遺伝子の差異を網羅的に明らかにした点に新規性がある。SMAD4は高頻度に膵癌で変異が報告されている重要な癌抑制遺伝子である。SMAD4が癌細胞に発現するENGの発現を誘導することを明らかにし、さらにSMAD4変異後のENGの発現減少が膵癌細胞の浸潤能を亢進する可能性を示したことは医学における学術的な重要性が高い。SMAD4/ENG経路の発現制御が今後の膵癌治療に有用である可能性を示したことは臨床的な発展性が期待できる。以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。